

**Заключение диссертационного совета Д501.001.67
на базе Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»
по диссертации на соискание учёной степени кандидата наук**

Аттестационное дело №

Решение диссертационного совета от 15 декабря 2016 г. № 23

О присуждении Кулешовой Анне Александровне, гражданину Российской Федерации, учёной степени кандидата физико-математических наук.

Диссертация «Флуоресцентные характеристики наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах сывороточных альбуминов» по специальностям 01.04.05 — оптика и 03.01.02 — биофизика принята к защите 7 октября 2016 г., протокол № 22, диссертационным советом Д501.001.67 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1), созданным 19.10.2007, приказ № 2048-1288.

Соискатель Кулешова Анна Александровна, 1989 года рождения, в 2012 году окончила физический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по специальности «физика», в 2016 году окончила очную аспирантуру физического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Диссертация выполнена на кафедре общей физики физического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научные руководители:

Салецкий Александр Михайлович — доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой общей физики физического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», и Власова Ирина Михайловна — кандидат физико-математических наук, старший преподаватель кафедры общей физики физического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Официальные оппоненты:

Горелик Владимир Семенович — доктор физико-математических наук, профессор, заведующий лабораторией комбинационного рассеяния света отделения оптики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Физический институт имени П.Н.Лебедева» Российской академии наук, и Мельников Геннадий Васильевич — доктор химических наук, профессор, профессор кафедры «Физика» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.», — дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Оренбургский государственный университет» (г. Оренбург) — в своём положительном заключении, подписанном Жадановым Виктором Ивановичем, доктором технических наук, профессором, проректором по научной работе ОГУ, заведующим кафедрой строительных конструкций ОГУ, указал, что «диссертация Кулешовой Анны Александровны отвечает всем требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней и присвоения

ученых званий» на соискание ученой степени кандидата наук, а диссертант заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальностям 01.04.05 — оптика и 03.01.02 — биофизика, а Оренбургский государственный университет, как ведущая организация, назначенная Диссертационным советом Д 501.001.67 при МГУ им. М.В. Ломоносова, дает в этом соискателю Кулешовой А.А. соответствующую рекомендацию».

Соискатель имеет 23 опубликованные работы, все по теме диссертации, из них 7 статьи (общим объемом 45 стр.) в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК. Работы посвящены экспериментальному изучению процесса взаимодействия флуоресцентных маркеров с сывороточными альбуминами, описанию их флуоресцентных характеристик до и после взаимодействия при различных значениях pH среды. Все представленные в работах результаты получены автором лично или при его определяющем участии. В качестве наиболее значимых можно выделить следующие работы:

- 1) Vlasova I. M., Bukharova E. M., Kuleshova A. A., Saletsky A. M. Spectroscopic investigations of interaction of fluorescent nanomarkers of fluorescein family with human serum albumin at different values of pH// Current Applied Physics, 2011, Т. 11, №. 5, С. 1126-1132.
- 2) Власова И.М., Кулешова А.А., Салецкий А.М. Флуоресцентные характеристики и молекулярная ассоциация наномаркера бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека// Вестник Московского Университета. Серия 3. Физика. Астрономия, 2011, №. 5, С. 44-48.
- 3) Vlasova I.M., Kuleshova A.A., Panchishin A.I., Vlasov A.A. Investigation of interaction of fluorescent nanomarker Bengal Rose with human serum albumin at various values of pH//Journal of Molecular Structure, 2012, Т. 1016, С. 1-7.
- 4) Власова И.М., Кулешова А.А., Власов А.А., Салецкий А.М. Процессы молекулярной ассоциации и флуоресцентные характеристики наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина// Вестник Московского Университета. Серия 3. Физика. Астрономия, 2013, №. 4, С. 39-44.
- 5) Vlasova I.M., Kuleshova A.A., Vlasov A.A., Saletsky A.M. Investigation of binding of nanomarkers of fluorescein family to bovine serum albumin at various values of pH: Spectroscopic study// Journal of Molecular Structure, 2013, Т. 1051, С. 86-94.
- 6) Власова И.М., Кулешова А.А., Власов А.А., Салецкий А.М. Поляризованная флуоресценция в исследованиях вращательной диффузии маркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина // Вестник Московского Университета. Серия 3. Физика. Астрономия, 2014, №. 5, С. 36-40.
- 7) Власова И. М., Кулешова А.А., Власов А.А., Салецкий А.М. Вращательная диффузия маркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина по данным поляризованной флуоресценции// Журнал Физической Химии, 2015, Т. 89, №. 2, С. 345-350.

На диссертацию поступили отзывы официальных оппонентов и ведущей организации. Отзывы на автореферат поступили от следующих специалистов:

- 1) Брюханов Валерий Вениаминович, доктор физико-математических наук, профессор, ведущий научный сотрудник научно – образовательного центра «Лазерные нанотехнологии и информационная биофизика» научно – технологического парка «Фабрика» «Института физико – математических наук и информационных технологий» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» и Цибулькикова Анна Владимировна, кандидат физико-математических наук, старший

преподаватель «Института физико – математических наук и информационных технологий» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»;

- 2) Бодунов Евгений Николаевич, доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой «Физика» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Петербургский государственный университет путей сообщения Императора Александра I».
- 3) Ермолаев Валерий Леонидович, доктор физико – математических наук, профессор, ведущий инженер научно – исследовательского центра нанофотоники и оптоинформатики при Университете ИТМО (Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики»).
- 4) Пащенко Владимир Захарович, доктор физико – математических наук, профессор, заведующий сектором фотобиологии и биофотоники лаборатории космической биологии кафедры биофизики биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Все отзывы положительные. В них указывается, что диссертационная работа выполнена на высоком научном уровне, актуальность и новизна которой не вызывают сомнения, в работе решены поставленные перед соискателем серьёзные научные задачи, а результаты работы имеют несомненное практическое значение. Авторы всех отзывов указывают, что соискатель заслуживает присуждения ему учёной степени кандидата физико-математических наук.

Отзыв официального оппонента Горелика В.С. содержит следующие замечания:

1) В диссертации выполнена большая экспериментальная работа, но детали проведенных экспериментов отсутствуют. В частности, не приведены схемы экспериментальных установок, отсутствуют сведения о характеристиках возбуждающего излучения, о типах используемых поляризационных устройств и др. В результате воспроизведение результатов, полученных в данной диссертации, оказывается затруднительным.

2) В автореферате выводы об основных результатах в виде пунктов 3 и 7 об уменьшении коэффициентов вращательной диффузии в водных растворах САЧ и БСА, по сравнению с буферными растворами, практически совпадают.

Отзыв официального оппонента Мельникова Г.В. содержит следующие замечания:

1) На стр. 61 представлены спектры поглощения бенгальского розового концентрацией 50 мкМ. Как при таких значениях оптических плотностей учитывался возможный эффект перепоглощения в наномаркерах при обработке полученных результатов?

2) Для обнаруженного автором уменьшения интенсивности флуоресценции красителей при добавлении белка в буферный раствор лучше ввести термин «уменьшение интенсивности флуоресценции наномаркеров» вместо термина «тушение флуоресценции наномаркеров» белками.

3) Замечания по стилю:

стр.75 , 1-ый абзац, 5 –ая строка:

Напечатано: «Из рис. 3.37 видно, что зависимости $\Delta D_{\text{САЧ}}(C)$ и $\Delta D_{\text{САЧ}}(pH)$ практически одинаковы соответствующим зависимостям для БСА ...»

Надо: «Из рис. 3.37 видно, что зависимости $\Delta D_{\text{САЧ}}(C)$ и $\Delta D_{\text{САЧ}}(pH)$ практически совпадают с соответствующими зависимостями для БСА ...»

Отзыв ведущей организации — Оренбургского государственного университета — содержит следующие замечания:

- 1) Использование несколько неоднозначного термина «наномаркер», не вызывающего нареканий в широком смысле, но приводящего к разночтениям, поскольку долгие годы, вплоть до настоящего времени, сам низкомолекулярный зонд не было принято относить к нанообъектам, хотя таким объектом и является сама зондируемая система «маркер – белковый нанокластер». Насколько целесообразно употреблять его применительно к маркированию нанокластеров – вопрос выбора терминов, но традиции в их использовании («молекулярная метка», «молекулярный люминесцентный зонд») могли бы быть учтены автором при написании диссертации.
- 2) Остается без ответа вопрос о кинетике деполяризации люминесценции зонда, т.к. параметры вращательной диффузии молекулярных меток оцениваются на основе исключительно результатов спектрально – поляризационных измерений, проводимых со стационарным источником оптического возбуждения. Большой интерес представляли бы прямые измерения кинетики деполяризации свечения зондов в реальном времени

Отзыв на автореферат, поступивший от Брюханова В.В. и Цибульниковой А.В., содержит следующие замечания:

- 1) Из автореферата не совсем понятно, о какой характеристике структуры димеров идёт речь при определении углов между мономерными молекулами в димерах.

Во всех перечисленных отзывах отмечено, что указанные замечания не влияют на общую положительную оценку работы. Отзывы на автореферат, поступившие от Бодунова Е.Н., Ермолаева В.Л., Пашенко В.З. критических замечаний не содержат.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что оппоненты являются специалистами в областях, связанных с экспериментальными исследованиями оптических и биофизических систем и процессов, имеют многочисленные публикации по тематике диссертации, а ведущая организация известна своими достижениями в области спектроскопии и биофизики.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

1. Установлено, что для всех исследованных красителей в растворах, содержащих альбумины, значения интенсивности в максимумах спектров флуоресценции, значительно меньше аналогичных значений для буферных растворов этих красителей. С увеличением значения pH тушение флуоресценции производных флуоресцеина (Э, Эр, БР) под действием белков уменьшается.
2. Установлена независимость степени анизотропии флуоресценции молекул галоген-производных флуоресцеина от pH среды.
3. Определены коэффициенты вращательной диффузии флуоресцеина, эозина, эритрозина и бенгальского розового и установлено их уменьшение в растворах САЧ и БСА в широком диапазоне значений pH. Установлено уменьшение вращательной диффузии и увеличение времени вращательной релаксации в растворах САЧ и БСА по сравнению с их буферными растворами.
4. Показано, что при взаимодействии с сывороточными альбуминами изменения спектрально-флуоресцентных характеристик галоген-производных флуоресцеина (Э, Эр, БР) имеют схожие закономерности и отличаются от изменения характеристик самого флуоресцеина.

5. Установлено уменьшение степени ассоциации красителей семейства флуоресцеина в растворах белков по сравнению с буферными растворами, сопровождающееся изменением структуры ассоциатов.
6. Обнаружено, что при увеличении значения электроотрицательности боковых атомов радикалов в молекулах красителей семейства флуоресцеина их связывание с сывороточными альбуминами уменьшается в области от рI белков до физиологического рН = 7,4.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые проведено детальное исследование процесса взаимодействия флуоресцентных красителей, принадлежащих одному семейству – флуоресцеина, с сывороточными альбуминами, учитывающее влияния окружающей маркер или комплекс флуоресцентный зонд - белок среды, проведен анализ изменения флуоресцентных характеристик маркеров до и после присоединения к белкам, впервые получены данные изменения этого процесса при постепенном увеличении электроотрицательности боковых атомов радикалов флуорофоров.

Практическая значимость работы заключается в том, что результаты диссертационной работы являются основой для исследований и создания модели взаимодействия белков с лекарственными препаратами и позволяют не только оценить факторы, влияющие на него, но и модифицировать, усовершенствовать данный процесс.

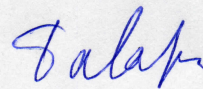
Оценка достоверности научных результатов, полученных в работе, подтверждается многократной повторяемостью результатов, которые соответствуют, там где возможно провести сопоставление, литературным данным; в работе использованы известные физические модели и математические методы; таким образом, корректность результатов, представляемых в диссертационной работе, не вызывает сомнений.

Личный вклад соискателя состоит в том, что все результаты получены автором лично или при его непосредственном участии. Автор принимал участие в постановке задачи, проведении экспериментов, обработке и анализе результатов, подготовке текстов статей и докладов на конференциях, лично выступал с устными и стендовыми докладами.

На заседании 15 декабря 2016 г. диссертационный совет принял решение присудить Кулешовой Анне Александровне учёную степень кандидата физико-математических наук.

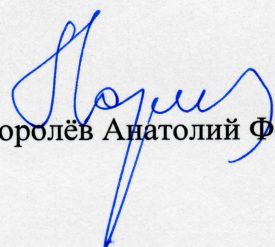
При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 27 человек, из них 7 докторов наук по специальности 01.04.05 и 3 доктора науки по специальности 03.01.02 рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: «за» — 26, «против» — нет, недействительных бюллетеней — 1.

Зам.председателя диссертационного совета Д501.001.67
доктор физико-математических наук,
профессор



Балакший Владимир Иванович

Учёный секретарь диссертационного совета Д501.001.67
кандидат физико-математических наук,
доцент



Королёв Анатолий Фёдорович

Дата оформления заключения: 16 декабря 2016 г.

Подписи В.И. Балакшего и А.Ф. Королёва заверяю
Учёный секретарь Учёного совета
физического факультета МГУ
профессор



Караваев Владимир Александрович